

## Vizsgálatok denitrifikáló baktériumok endogén légzésével kapcsolatosan

TIMÁR MÁTYÁS NÉ

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest

A biológiai disszimilatív nitrátredukció hatására létrejövő — mezőgazdasági szempontból káros — folyamatok kutatása két irányú. Egyrészt a talaj nitrogén háztartásának vizsgálatával mérhetők a denitrifikáció terhére történő veszteségek, másrészt a folyamatban résztvevő organizmusok élettanának kutatásával felderíthetők azok a körülmények, melyek a denitrifikálók élettevékenységét limitálják. E két irányú vizsgálatok eredményeként többek között ma már tudjuk [1], hogy szántóföldi körülmények között az évenként adagolt nitrogén műtrágyából 10—15% az a nitrogén mennyiség, amely a biológiai denitrifikáció során  $N_2$  vagy  $N_2O$  formájában eltávozhat a talajból. A folyamatért felelős organizmusok élettani sajátosságainak kutatása [4] rávilágított arra a tényre, hogy a növények gyökérzónájában, különösen élő lágyszárú kultúrák esetében a denitrifikációs folyamatok számára előnyös környezeti feltételek alakulhatnak ki, egyrészt azért, mert az  $O_2$  tenziója a növény és a rizoszférában élő mikroszervezetek anyagcserefolyamatai miatt alacsonyabb, mint a talaj más részeiben, másrészt a gyökerek olyan vegyületeket bocsátanak ki, melyeket az egyes baktériumfajok, többek között nitrátredukciós folyamataik kapcsán, előnyösen tudnak hasznosítani.

A baktériumok élettani sajátosságainak vizsgálata gyakran rendszertani besorolásuk érdekében történik, ami azt jelenti, hogy fiziológiai teljesítőképességük egész spektrumát fel kell venni. A denitrifikációs képesség szempontjából azonban ezek az adatok csak arra adhatnak választ, hogy egy bizonyos komplex tápanyag jelenlétében képes-e egy bizonyos faj nitrátból nitritet, vagy éppen valamilyen gáz alakú végterméket előállítani.

Viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre arról, hogy a rendszertanilag eltérő, de disszimilatív nitrátredukcióra képes fajoknál a pH,  $O_2$  tenzió, az  $NO_3^-$  illetve  $NO_2^-$  koncentrációja, a különböző minőségű szénvegyületek stb. hogyan hatnak a folyamatra.

Természetszerűleg a disszimilatív nitrátredukció sajátosságai kizárólag élettani tulajdonságok kutatásával nem ismerhetők meg, a folyamatot egyrészt biokémiai, másrészt szinökológiai kutatások eredményeivel összhangban lehet csak értékelni. Vizsgálataink kiinduló pontját WOLDENDORP [4] kutatási eredményei képezték, aki megállapította, hogy a talajból nagy gyakorisággal izolálható disszimilatív nitrátredukcióra képes fajok közül, többek között, mind a *Bacillus licheniformis*, mind a *Pseudomonas stutzeri* a nitrátból gázformájú végterméket állít elő, az előbbi ammoniát, az utóbbi  $N_2O$ -t illetve  $N_2$ -t képez. Megállapították azt is, hogy a nitrátredukció biokémiai útját a szén-

forrás minősége befolyásolja, és hogy egy fajon belül is a nitrát illetve nitrit redukciója eltérő elektrondonorok jelenlétében eltérő módon megy végbe.

Mikor azonban ezeket a kérdéseket vizsgálni kezdtük, feltűnt, hogy a nevezett organizmusok mosott sejtjei elektrondonor adagolása nélkül is, tartalék tápanyagaik terhére jelentős mennyiségű nitrát redukálására képesek anaerob körülmények között, és ez a különböző fajoknál eltérő módon történik. Tekintettel arra, hogy az említett organizmusok endogén légzésével kapcsolatosan a szakirodalomban nem találtunk adatot (a *Ps. aeruginosa* disszimilatív nitrát redukciójának biokémiáját és élettani sajátosságait [2, 3] valamint aerob légzését részletesebben már kutatták [3]), három organizmus esetében (*Ps. stutzeri*, *Ps. aeruginosa*, valamint *B. licheniformis*) kíséreltük meg a nitrát illetve nitrit jelenlétében folytatott endogén légzés sajátosságait megismerni.

### Anyag és módszer

A vizsgálatok céljából a sejteket mindhárom organizmus esetében az alábbi összetételű táptalajon szaporítottuk el: 1000 ml pH 7,3 foszfát puffer (0,15 M), 2 g  $\text{KNO}_3$ ; 2 g almasav; 2 g élesztőkivonat; 1 ml Hoagland oldat. Az előtenyésztés 500 ml táptalajban történt, gumidugóval lezárt lombikban, levegőztetés nélkül. 24 óra múlva a tenyészetet centrifugáltuk, háromszor mostuk foszfát pufferrel. Ezután a sejteket pufferben szuszpendáltuk és alikvot mennyiségeket THUNBERG csövekbe osztottunk szét. A kísérleti körülményektől függően, meghatározott koncentrációban  $\text{KNO}_3$ -t, vagy  $\text{NaNO}_2$ -t adtunk a sejtekhez, majd 5 vagy 10 ml végtérfogatra töltöttük fel a szuszpenziót. Az anaerob feltételek biztosítása érdekében evakuáltuk a csöveket. Az előtenyésztés és a vizsgálati időszak alatt 28 °C-os termosztátban tartottuk a tenyészeteket. Mintavételkor 0,1 ml-es alikvotokat 0,5 ml etanolba csöpögtettük, majd a THUNBERG csöveket újbólevakuáltuk. A mintavételek 10–20 percenkénti gyakorisággal történtek. A kísérleti időtartam általában 300 perc volt, egyes esetekben 600. A 24. órában ellenőriztük az összes keletkezett, vagy fogyott nitrit mennyiségét. Egyféle kezelést 3–5 ismétlésben vizsgáltunk, ezenkívül a kísérletek elején és végén minden egyes mintában spektrofotométeren 660 nm-en ellenőriztük a sejtsűrűséget, mely a vizsgálati idő alatt egyik esetben sem változott. A nitrit koncentráció változását kolorimetriásan mértük. Az etanolba csöpögtetett mintákat megfelelő térfogatra feltöltöttük, majd 1 ml Griess-Ilosvay reagenst tettünk az oldathoz, a színreakciót kialakulása után 520 nm-nél mértük. A vizsgálatoknál *Pseudomonas stutzeri* CCEB 522, *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. polycolor* NCPPB 292), *Bacillus licheniformis* IP 5271 törzseivel dolgoztunk.

### Kísérleti rész

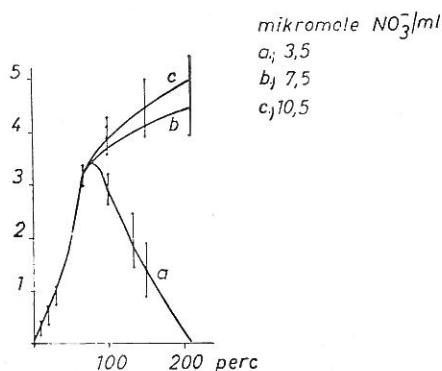
#### *Endogén légzés nitrát jelenlétében*

##### *Pseudomonas stutzeri:*

Az első ábrából látható, hogy a *Ps. stutzeri* mosott sejtjei 3,5 mikromole/ml nitátot elektrondonorként hasznosítható szubsztrát adagolása nélkül is átalakítanak. A denitrifikációs folyamatokra jellemző, hogy először az összes nitrátot nitritté alakítják. A nitrit redukciója csak akkor indul meg, amikor

már nitrát nincs a környezetben. A nitrátredukció szakaszában a folyamat sebessége nagyobb, mint az ezt követő nitritredukciókor. Az azonos kezelésű minták esetében mért adatok szórása a nitrátredukció szakaszában elhanyagolható, a nitrit redukciónál nő. Ismételt vizsgálatok (lásd 2. ábra „a” görbéje) arra mutatnak, hogy a szóbanforgó folyamatra jellemző dinamika hasonló, azonban a sebesség az előtenyésztéstől függően változik.

Ha az előtenyésztés folyamán a *Ps. stutzeri* sejtjeit hosszabb ideig nitrát tartalmú táptalajon passzáltuk és azután kívántuk elszaporítani az anyagot, úgy a sejttömeg kevés volt és a nitrit nagy mennyiségben felhalmozódott a táptalajban. Ezért a vizsgálatok során úgy jártunk el, hogy burgonyás agarról kétszer passzáltunk, folyékony, almasavat, élesztőkivonatot és nitrátot tartalmazó táptalajban, ezután ugyanilyen összetételű 500 ml táptalajban szaporítottuk el a sejteket. Ennél az eljárásnál 24 óra múlva erőteljes gázképződés volt tapasztalható, nitrit csak nyomokban volt kimutatható és a kitermelt sejtmennyiség súlya 20–30 mg/l között ingadozott.



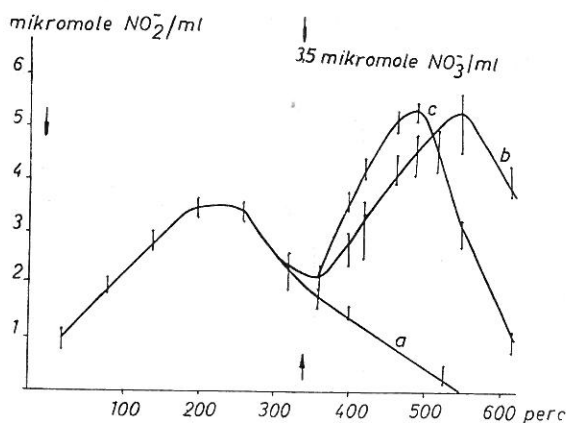
1. ábra

Nitrit képződés és fogyasztás *Ps. stutzeri* mosott sejtjeinek anaerob endogén nitrát légzése folyamán, változó mennyiségű nitrát jelenlétében (2 mg/ml száraz sejt súlya)  
Függőleges tengely: mikromole  $\text{NO}_2^-/\text{ml}$

Az 1. ábrán az endogén légzésre jellemző görbéket közöltük azokra az esetekre vonatkozóan is, amikor a nitrát mennyisége zero időpontban 7 és 10,5 mikromole/ml volt. Növekvő nitrát mennyiségek hatására az első 50 perces időszakban a nitrit képződés sebessége megegyezik a 3,5 mikromole/ml esetében tapasztalttal. Ezután, — bár lassabban — a keletkező nitrit mennyisége nő, de a vizsgálati idő alatt a nitritredukciós folyamatok nem indulnak meg.

A 2. ábrán közölt görbék szakaszos nitrát adagolás hatására mutatják be a nitrát redukciós folyamatot. Ebben az esetben 9 párhuzamos mintához a kísérlet null időpontjában 3,5 mikromole/ml nitrátot adtunk, majd a nitrit redukció szakaszában (320 perc után amikor már csak 27–37  $\gamma/\text{ml}$   $\text{NO}_2^- - \text{N}$  volt kimutatható) három párhuzamos mintához újabb 3,5 mikromole/ml nitrátot adtunk „b” görbe), további három párhuzamos mintához pedig a nitráton kívül 3 mikromole/ml glutaminsavat adtunk („c” görbe). Az „a” jelzésű görbe kizárólag a kísérlet null időpontjában 3,5 mikromole/ml nitrátot kapott

minták nitrit koncentrációjának változását mutatja be. A „b” görbéből látható, hogy az újabb nitrát adag hatására a nitrit redukiót végző sejtek rövid átállási időszak után, függetlenül attól, hogy nitrit jelen volt-e a környezetben, a nitrátot kezdték el újból hasznosítani. Erre egyértelmű bizonyítékot szolgáltat az a tény, hogy az első szakaszból maradt nitrit és a második szakaszban  $\text{NO}_3^-$  formájában adott nitrogén a kísérlet 550. percében visszamérhető nitrit formájában. A nitrit redukiója ezután az időszak után újból megkezdődik, de már nem használódik fel teljesen. (24 óra múlva  $20-60\gamma\text{NO}_2-\text{N}/\text{ml}$  még mérhető).



2. ábra

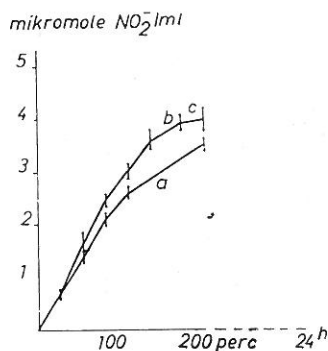
Nitrit képződés és fogyasztás *Ps. stutzeri* mosott sejtjeinek endogén légzése során szakaszos nitrát terhelés esetében (1,7 mg/ml sejt szárazsúly). a) 0 időpontban 3,5 mikromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$ . b) 0 időpontban 3,5 mikromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$ , továbbá 340. percben 3,5 mikromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$ . c) 0 időpontban 3,5 mikromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$ , + 3 mikromole glutaminsav/ml, továbbá a 340. percben 3,5 mikromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$

Valószínűnek látszik, hogy azok a tartaléktápanyagok, melyek az előtenyésztés folyamán a sejtben felhalmozódtak, a 7 mikromole nitrát/ml anyag redukálásához már nem elegendőek. A „c” görbe adatai azt bizonyítják, hogy a glutaminsav jelenléte lehetővé tette a magasabb nitrátdózis teljes kihasználását. Ebben az esetben is tapasztalható volt az a jelenség, hogy a *Ps. stutzeri* elsődlegesen a nitrátot hasznosítja akkor is, ha nitrit jelen van és csak a nitrát eltűnése után tér rá a nitrit felhasználására.

#### *Bacillus licheniformis*:

A 3. ábrából látható, hogy a *Ps. stutzeri*hez hasonlóan a *B. licheniformis* is endogén légzést folytat nitrát jelenlétében anaerob körülmények között. Ennek eredményeként 3,5 mikromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$  a kísérleti idő végén teljes egészében mérhető nitrit formájában. A nitrit redukiója azonban az endogén légzés során nem tapasztalható. Más vizsgálatainknál, meghatározott elektron donorok esetében, a keletkező nitrit fogyasztása is mérhető volt, azonban, ha ilyen összetételű táptalajokon tenyésztettük a sejteket, majd centrifugálás és mosás után az endogén légzést vizsgáltuk, nitrit redukió ugyancsak nem volt kimutatható.

A 3. ábra „b” görbájén 7 mikromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$  jelenlétében mutatjuk be a nitrit képződését az endogén légzés folyamán. A kísérleti idő 220. percéig a nitrit képződés sebessége megközelítően azonos a 3,5 mikromole/ml esetében tapasztaltal, a 24 óra múlva mért értékek azonban azt bizonyítják, hogy 7 mikromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$  teljes egészében nitritté alakul.



3. ábra

Nitrit képződés *B. licheniformis* mosott sejtjeinek endogén légzése során (0,88 mg/ml sejt szárazsúly)

#### *Pseudomonas aeruginosa*:

Tájékozódó vizsgálatok arra utalnak, hogy a *Ps. aeruginosa* is hasznosítja a nitrátot az endogén légzés folyamán, azonban a nitrit nem jelenik meg és nem halmozódik fel a folyamat során. Mivel a nitrát ion koncentrációjának változásának mérésére alkalmazott kolorimetriás módszerek egyike sem bizonyult reprodukálhatónak, e tekintetben csak megfigyeléseket közölhetünk. 3,5, 7 és 70 mikromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$  jelenlétében, 200 perces kísérleti idő alatt  $\text{NO}_2^-$  nem képződött és 24 óra múlva sem volt nitrit mérhető. A nitrát jelenlétét null időpontban mindhárom kezelésnél kimutattuk. A 3,5, 7 mikromole/ml koncentrációk esetében 24 óra múlva nitrát ionra negatívnak találtuk, a 70 mikromole/ml esetében még jelen volt az oldatban, de feltételezhetően egy része felhasználódott.

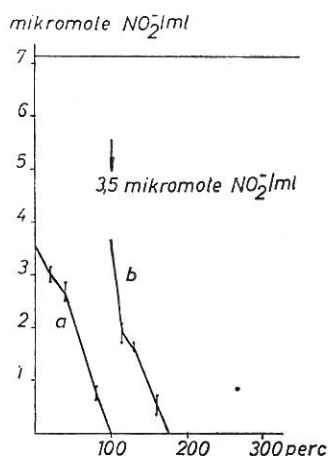
#### Endogén légzés nitrit jelenlétében

##### *Pseudomonas stutzeri*:

A 4. ábráról látható, hogy a *Ps. stutzeri* sejtjei nitritnek mint kiinduló anyagnak jelenlétében is endogén légzést folytatnak. 3,5 mikromole  $\text{NO}_2^-/\text{ml}$  koncentráció esetében a nitrit gyorsan elfogy a táptalajból („a” görbe), 7 mikromole/ml koncentráció esetében azonban a nitrit redukciója nem tapasztalható („b” görbe).

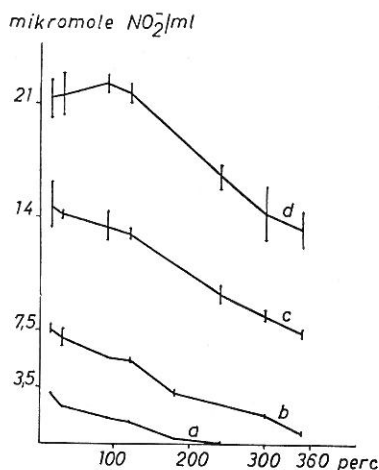
Amennyiben 7 mikromole/ml nitrittel szakaszosan terheljük a sejteket (4. ábra „c” görbéje), tehát null időpontban 3,5 mikromole/ml és ennek elfogyása után újabb 3,5 mikromole/ml nitritet adunk, úgy a  $\text{NO}_2^-$  teljes egészében redukálódik. A kísérletek eredményei azt bizonyítják, hogy a 7 mikromole/ml

koncentráció már gátolja a sejtek életműködését, mivel szakaszos terhelés esetén ugyanez az anyagmennyiség felhasználódik.



4. ábra

*Ps. stutzeri* mosott sejtjeinek nitrit redukciója endogén légzés során (1,7 mg/ml sejt száraz-súly): a) 0 időpontban 3,5 mikromole NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml b) 0 időpontban 3,5 mikromole NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml 100. percen + 3,5 mikromole NO<sub>2</sub><sup>-</sup> c) 0 időpontban 7 mikromole NO<sub>2</sub><sup>-</sup>



5. ábra

*Ps. aeruginosa* nitrit redukciója változó mennyiségű nitrit jelenlétében (2,85 mg/ml sejt száraz súly) a) 3,5 mikromole NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml; b) 7 mikromole NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml; c) 14 mikromole NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml; d) 21 mikromole NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml.

#### *Pseudomonas aeruginosa*:

A *Ps. aeruginosa* nitrit redukcióját endogén légzés közben 3,5, 7, 14 és 21 mikromole/ml nitrit jelenlétében vizsgáltuk. Az eredményeket az 5. ábrán ismertetjük.

Látható, hogy 21 mikromole/ml koncentráció esetében sem tapasztalható jelentősebb mértékű gátlás és az összes vizsgált koncentrációknál a nitrit-redukció megközelítően azonos sebességgel megy végbe a kísérleti idő 360. percéig. A 24. órában nitrit már egyik kezelésben sem mutatható ki.

A *Bacillus licheniformis* endogén légzését nitrit jelenlétében az általunk alkalmazott kísérleti feltételek között nem tudtuk kimutatni.

#### Az eredményekből levonható következtetések

Három organizmus esetében a sejtekben felhalmozott tartalék tápanyagok terhére történő disszimilatív nitrátredukció sajátosságait vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy mindhárom organizmus jelentős mennyiségű nitrát- illetve nitrit-iont használ fel az endogén légzése folyamán, de a nitrát-nitrit, valamint a nitrit további redukciója mindhárom organizmusnál eltérő.

A *Ps. stutzeri* a nitrátot előbb teljes egészében nitritté alakítja és csak azután indul meg a nitrit redukciója. A *Ps. aeruginosa* a nitritet a nitráttal

egyidejűleg alakítja át, nitrit felhalmozás nincsen. A *Bacillus licheniformis* nitritet képez nitrátból, azonban a nitritet nem redukálja endogén légzése folyamán.

Nitritnek, mint kiinduló anyagnak jelenlétében a *Ps. stutzeri* szintén endogén légzést folytat, azonban a nitrit, annak ellenére, hogy nitrát kiindulási anyag esetében mint köztes termék felhalmozódik a környezetben, nagyobb koncentrációban gátolja a sejtek működését. A *Ps. aeruginosa*, bár köztes termékként nem halmoz fel nitritet, mégis nitritnek mint kiindulási anyagnak a jelenlétében még 21 mikromole/ml  $\text{NO}_2^-$  esetében sem tapasztalható lényeges gátlás.

### Összefoglalás

1. *Ps. stutzeri*, *Ps. aeruginosa* és *B. licheniformis* endogén légzést folytat anaerob körülmények között,  $\text{NO}_3^-$ -nak vagy  $\text{NO}_2^-$ -nek mint elektron akceptornak jelenlétében.

2. a) A *Ps. aeruginosa* anaerob endogén nitrát-légzése során nem észlelhető nitrit felhalmozódás.

b) A *Ps. stutzeri* esetében az adott nitrát teljes egészében nitritté alakul, majd ezt követi a felhalmozott nitrit felhasználása.

c) A *B. licheniformis* anaerob endogén-légzésére jellemző, hogy nitrátból nitrit képződik és felhalmozódik a környezetben.

3. A vizsgált organizmusok közül a *Pseudomonas*ok endogén légzése nitrit jelenlétében is tapasztalható, *B. licheniformis*nál nem.

4. A nitrát koncentráció emelésének hatására a *Ps. stutzeri* esetében a nitrit képződése fokozódik, de a képződött nitrit már csak részlegesen hasznosul.

Növekvő nitrát adagok esetében a *B. licheniformis* nitrát redukciójának sebessége megközelítően azonos. 7 mikromole  $\text{NO}_3^-$ /ml is teljes egészében nitritté alakul.

5. Növekvő nitrit mennyiségekkel elvégzett kísérleteinkből kitűnik, hogy 7 mikromole/ml  $\text{NO}_2^-$  már gátlólag hat a *Ps. stutzeri* sejtjeinek élettevékenységére. Ugyanilyen nitrit mennyiség szakaszos adagolás esetén teljes egészében redukálódik.

6. A *Ps. aeruginosa* esetében csak 21 mikromole  $\text{NO}_2^-$ /ml jelenlétben észlelhető kisebb mértékű gátlás, majd rövid adaptációs időszak után 3,5, 7, 14, 21, mikromole  $\text{NO}_3^-$ /ml azonos sebességgel fogy a táptalajból és teljesen elhasználódik.

### Irodalom

- [1] BROADBENT, F. E. & CLARK, F.: Denitrification. In: Soil Nitrogen. Ed. Bartholomew, W. V. & Clark, F. E. Ser. Agronomy 10. 344—357. Am. Soc. Agron. Madison. 1965.
- [2] EAGON, R. G.: Composition of an extracellular slime produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Can. J. Microbiol. 8. 585—586. 1962.
- [3] WARREN, R. A. J., ELLS, A. F. & CAMPBELL, J. J. R.: Endogenous respiration of *Ps. aeruginosa*. J. Bacteriol. 79. 875—879. 1960.
- [4] WOLDENDORP, J. W.: The influence of living plants on denitrification. Meded. Landb.-Hoogeschool Wageningen. 63. (13). 1—100. 1963.

Érkezett: 1969. augusztus 25.



## Studies of the Endogenous Respiration of Denitrifying Bacteria

É. TIMÁR

Research Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

## Summary

The dissimilative nitrate reduction was studied in the case of resting cell suspensions of *Pseudomonas stutzeri*, *Ps. aeruginosa* and *Bacillus licheniformis*. The cells were grown anaerobically in a medium containing malic acid, yeast extract and nitrate.

After harvesting and washing the cells were suspended in a buffered medium which contained nitrate. Results:

1. *Ps. stutzeri*, *Ps. aeruginosa* and *B. licheniformis* utilize nitrate as electron acceptor during the anaerobic endogeneous respiration.

2. a) In the course of anaerobic nitrate respiration of *Ps. aeruginosa* nitrite accumulation could not be established.

b) In the case of *Ps. stutzeri* the given quantity of nitrate entirely transforms into nitrite and the next stage is the utilization of the accumulated nitrite (Figure 1, curve „a'”).

c) The characteristic feature of the anaerobic endogeneous respiration of *B. licheniformis* is that nitrite develops from nitrate and accumulates in the surroundings (Figure 3, curve „a'”).

3. Nitrites as electron acceptor can be used by all the two *Pseudomonas* but not by *B. licheniformis*.

4. The effect of the increase of the nitrite concentration in the case of *Ps. stutzeri* is the increase of nitrite formation but the nitrite formed is only partially utilized (Figure 1, curves „b'” and „c'”). In the case of increased doses of nitrate the rate of nitrate reduction is approximately the same. 7 micromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$  also entirely changes into nitrite. (Figure 2, curves „a'” and „b'”).

5. It appears from our experiments done with increasing quantities of nitrite that 7 micromole/ml  $\text{NO}_3^-$  inhibits the life functions of the cells of *Ps. stutzeri*. The same quantity of nitrite if intermittently dosed is completely reduced.

6. In the case of *Ps. aeruginosa* a lesser degree of inhibition is experienced only in the presence of 21 micromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$ . 3,5, 7, 14, 21 micromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$  decreases in the medium and is subsequently completely utilized.

Fig. 1. Formation and decrease of nitrite in the course of the anaerobic endogeneous respiration of the washed cells of *Ps. stutzeri*, in the presence of changing quantities of nitrate (dry weight of the cells: 2 mg/ml)

Fig. 2. Formation and decrease of nitrite in the anaerobic endogeneous respiration of the washed cells of *Ps. stutzeri* in the case of periodical load of nitrate (dry weight of the cells: 1,7 mg/ml). a) at 0 time: 3,5 micromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$ ; b) at 0 time: 3,5 micromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$ , next in the 340th minute: 3,5 micromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$ ; c) at 0 time: 3,5 micromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$  + 3 micromole glutamic acid/ml, next in the 340th minute: 3,5 micromole  $\text{NO}_3^-/\text{ml}$

Fig. 3. Formation of nitrite in the course of endogeneous respiration of the washed cells of *B. licheniformis* (dry weight of the cells: 0,88 mg/ml)

Fig. 4. Nitrite reduction of washed cells of *Ps. stutzeri* in the case of endogeneous respiration (dry weight of cell: 1,7 mg/ml). a) at 0 time 3,5 micromole/ml  $\text{NO}_2^-$  b) at 0 time 3,5 micromole/ml  $\text{NO}_2^-$  at the 100th minute + 3,5 micromole/ml  $\text{NO}_2^-$  c) at 0 time 7,0 micromole/ml  $\text{NO}_2^-$

Fig. 5. Nitrite reduction of *Ps. aeruginosa* in the presence of changing quantities of nitrite (dry weight of cells: 2,85 mg/ml).



## Zum Problem der endogenen Atmung denitrifizierender Bakterien

É. TIMÁR

Forschungsinstitut für Bodenkunde und Agrikulturchemie der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest

### Zusammenfassung

Im Falle von drei Organismen wurden die Kennzeichen der zu Lasten der in den Zellen sich anhäufenden Nährstoffvorräte vor sich gehenden dissimilativen Nitratreduktion untersucht.

Die Versuche wurden in Thunberg-Röhren mit *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus licheniformis* durchgeführt. Die Stämme wurden vorher in Apfelsäure-, Hefeextrakt-, bzw. nitrathaltigen Nährlösungen gezogen, dann mehrmal ausgewaschen und zentrifugiert. Es wurde folgendes festgestellt:

1. *Pseudomonas stutzeri*, *Ps. aeruginosa* und *B. licheniformis* atmen unter anaeroben Bedingungen in Abwesenheit von  $\text{NO}_3^-$ , sowie  $\text{NO}_2^-$  als Elektronenakzeptoren.

2. a) Im Laufe der anaeroben Nitratatmung von *Ps. aeruginosa* kann keine Nitritanhäufung beobachtet werden.

b) Im Falle von *Ps. stutzeri* wandelt sich die  $\text{NO}_3^-$  Gabe vollständig in Nitrit um, und nachher wird das angereicherte Nitrit aufgebraucht (Abb. 1., Kurve „a“).

c) Die Bildung von Nitrit aus Nitrat ist kennzeichnend für die endogene Atmung von *B. licheniformis*. Das Nitrit häuft sich dann in der Umgebung an (Abb. 3., Kurve „a“).

3. Die endogene Atmung in Abwesenheit von Nitrit kann bei den *Pseudomonas*-Arten beobachtet werden, bei dem *B. licheniformis* dagegen nicht.

4. Bei Steigerung der Nitratkonzentration wird im Falle von *Ps. stutzeri* die Nitrit-Bildung erhöht, das entstandene Nitrit wird aber nur teilweise aufgebraucht (Abb. 1., Kurven „b“ und „c“). Bei Steigerung der  $\text{NO}_3^-$ -Gaben bleibt die Geschwindigkeit der Nitratreduktion von *B. licheniformis* beinahe gleich.  $7 \mu\text{M NO}_3^-/\text{ml}$  werden auch noch vollkommen reduziert (Abb. 2., Kurven „a“ und „b“).

5. Aus unseren, mit ansteigenden  $\text{NO}_2^-$ -Mengen durchgeführten Versuchen geht hervor, dass  $7 \mu\text{M NO}_2^-$  die Lebenstätigkeit von *Ps. stutzeri*-Zellen schon hemmt. Dieselbe  $\text{NO}_2^-$ -Menge wird im Falle einer fraktionierten Dosierung vollständig reduziert.

6. Bei *Ps. aeruginosa* zeigt sich eine geringere Hemmung nur in Abwesenheit von  $21 \mu\text{M NO}_2^-/\text{ml}$ , und nach einer kürzeren Adaptationsperiode nimmt der  $\text{NO}_2^-$ -Gehalt des Nährbodens mit 3,5, 5, 7, 14 und  $21 \mu\text{M/ml}$  Nitritkonzentration mit gleicher Geschwindigkeit ab und wird vollständig verwendet.

Abb. 1. Nitritbildung und -abnahme während der endogenen  $\text{NO}_3^-$ -Atmung der ausgewaschenen *Ps. stutzeri*-Zellen in Abwesenheit von Nitrat in verschiedenen Mengen (Trockengewicht der Zellen: 2 mg/ml)

Abb. 2. Nitritbildung und -abnahme während der endogenen Atmung der ausgewaschenen *Ps. stutzeri*-Zellen bei einer periodischen  $\text{NO}_3^-$ -Belastung (Trockengewicht der Zellen: 1,7 mg/ml). a) Zum Zeitpunkt 0:  $3,5 \mu\text{M NO}_3^-/\text{ml}$ ; b) Zum Zeitpunkt 0:  $3,5 \mu\text{M NO}_3^-/\text{ml}$  und in der 340sten Minute:  $3,5 \mu\text{M NO}_3^-/\text{ml}$ ; c) Zum Zeitpunkt 0:  $3,5 \mu\text{M NO}_3^-/\text{ml}$  +  $3 \mu\text{M Glutaminsäure/ml}$ , ferner in der 340sten Minute:  $3,5 \mu\text{M NO}_3^-/\text{ml}$

Abb. 3. Nitritbildung während der endogenen Atmung der gewaschenen *B. licheniformis*-Zellen (Trockengewicht der Zellen: 0,88 mg/ml)

Abb. 4. Nitritreduktion der gewaschenen *Ps. stutzeri*-Zellen während der endogenen Atmung (Trockengewicht der Zellen: 1,7 mg/ml). a) Zum Zeitpunkt 0:  $3,5 \mu\text{M NO}_2^-$ ; b) Zum Zeitpunkt 0:  $3,5 \mu\text{M NO}_2^-$ ; in der 100sten Minute +  $3,5 \mu\text{M NO}_2^-$ ; c) Zum Zeitpunkt 0:  $7,0 \mu\text{M NO}_2^-$ .

Abb. 5. Nitritreduktion von *Ps. aeruginosa* in Abwesenheit von verschiedenen  $\text{NO}_2^-$ -Konzentrationen, in  $\mu\text{M}$  (Trockengewicht der Zellen: 2,85 mg/ml)

## Изучение эндогенного дыхания денитрифицирующих бактерий

Е. ТИМАР

Научно-исследовательский институт почвоведения и агрохимии АН Венгрии, Будапешт

## Резюме

Изучалась диссимилятивная редукция азота, проходившая за счет накопленных питательных веществ в клетках трёх микроорганизмов.

Опыты проводились в трубках Thunberg с хорошо отмытыми и отцентрифугированными клеточными суспензиями *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus licheniformis*, выращенных на питательных средах, содержащих яблочную кислоту, дрожжевую вытяжку и азот. В ходе исследований установили, что:

1. *Ps. stutzeri*, *Ps. aeruginosa*, *B. licheniformis* продолжали эндогенное дыхание в анаэробной среде, в присутствии  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{NO}_2^-$  как электронных акцепторов.

2. а) При анаэробном нитратном дыхании *Ps. aeruginosa* не отмечалось накопление нитритов.

б) В случае *Ps. stutzeri* внесенный нитрат полностью превращался в нитрит и затем уже следовало использование накопленного нитрита (Рисунок 1, кривая «а»).

с) Для анаэробного эндогенного дыхания *B. licheniformis* характерно, что из нитрата в окружающей среде образуется и накапливается нитрит (Рисунок 3, кривая «а»).

3. Среди изученных организмов у *Pseudomonas* также наблюдалось эндогенное дыхание в присутствии нитрита, а у *B. licheniformis* этого не отмечалось.

4. В случае *Ps. stutzeri* под влиянием увеличения концентрации нитратов увеличивается образование нитритов, но они усваиваются только частично. (Рисунок 1, кривые «b» и «с»). При увеличивающихся дозах нитратов скорость их редукции для *B. licheniformis* приблизительно одинаковая. 7 микромоляр  $\text{NO}_3^-$ /мл полностью превращается в нитриты. (Рисунок 2, кривые «а» и «b»).

5. Данные опытов с применением увеличивающихся доз нитритов показали, что концентрация  $\text{NO}_2^-$  равная 7 микромолям уже препятствует нормальной жизнедеятельности клеток *Ps. stutzeri*. Подобное количество нитритов при дробном внесении полностью редуцируется.

6. Для *Ps. aeruginosa* только при концентрации  $\text{NO}_2^-$  в 21 микромоляр/мл отмечается незначительное торможение, затем после небольшого периода адаптации  $\text{NO}_2^-$  в концентрациях 3,5, 5, 7, 14, 21 микромоляр/мл расходуется из питательной среды с одинаковой скоростью и полностью усваивается.

**Рис. 1.** Образование и расход нитритов в процессе анаэробного эндогенного нитритного дыхания отмытых клеток *Ps. stutzeri* в присутствии различного количества нитратов (вес сухих клеток 2 мг/мл).

**Рис. 2.** Образование и расход нитритов в процессе эндогенного дыхания отмытых клеток *Ps. stutzeri* при дробной нитратной нагрузке (вес сухих клеток 1,7 мг/мл). а) В начале опыта 3,5 микромоляр/мл  $\text{NO}_3^-$  б) В начале опыта 3,5 микромоляр/мл  $\text{NO}_3^-$  спустя 340 минут 3,5 микромоляр/мл  $\text{NO}_3^-$  с) В начале опыта 3,5 микромоляр/мл  $\text{NO}_3^-$  + 3 микромоляр/мл глютаминовой кислоты, спустя 340 минут 3,5 микромоляр/мл  $\text{NO}_3^-$

**Рис. 3.** Образование нитрата в процессе эндогенного дыхания отмытых клеток *B. licheniformis* (Сухой вес клеток 0,88 мг/мл).

**Рис. 4.** Редукция нитритов в процессе эндогенного дыхания отмытых клеток *Ps. stutzeri* (Сухой вес клеток 1,7 мг/мл). а) В начале опыта 3,5 микромоляр/мл  $\text{NO}_2^-$  б) В начале опыта 3,5 микромоляр/мл  $\text{NO}_2^-$  спустя 100 минут + 3,5 микромоляр/мл  $\text{NO}_2^-$  с) В начале опыта 7,0 микромоляр/мл  $\text{NO}_2^-$

**Рис. 5.** Редукция нитритов *Ps. aeruginosa* в присутствии различных количеств нитритов. (Сухой вес клеток 2,85 мг/мл.)